

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 631—635, November 1969

Eine teilautomatische Methode zur Bestimmung von Dopamin¹⁾ im Urin

Von H. WISSER und D. STAMM

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

(Eingegangen am 30. Juli 1969)

Es wird eine teilautomatische Methode zur fluorometrischen Dopaminbestimmung im Urin beschrieben. Dazu wurde das manuelle Verfahren von ANTON und SAYRE (1) auf den Autoanalyser adaptiert. Die optimalen Meß- und Reaktionsbedingungen wurden ermittelt, die Zuverlässigkeitskriterien geprüft. Die Methode wurde bei der Bestimmung der Dopaminausscheidung in 3-Stunden-Urinproben bei einem Teil einer größeren Versuchsreihe über circadiane Rhythmen angewandt.

A semi-automatic method for the measurement of dopamine in urine

A semi-automatic method is described for the fluorometric determination of urinary dopamine. This is based on the adaption of the manual method of ANTON and SAYRE (1) to the autoanalyser. The optimal measurement and reaction conditions were determined and the criteria of reliability were tested. The method was used for the determination of dopamine excretion in some 3 hour urine samples from an extensive series of experiments on circadian rhythms.

Zur Bestimmung von Dopamin gibt es eine Reihe fluorometrischer Verfahren. Die einzelnen Methoden unterscheiden sich nur in der Verwendung unterschiedlicher Oxydationsmittel, wenn man von Besonderheiten bei der Abtrennung (2, 3) absieht. Die erste fluorometrische Bestimmung von Dopamin wurde von CARLSON und WALDECK (4) durchgeführt. Dabei wird als Oxydationsmittel Jod/Kaliumjodid benutzt. Von dieser Methode gibt es zahlreiche Modifikationen (2, 3, 5, 6, 7, 8) mit Reaktionszeiten zwischen 10 Min. und 20 Stdn. UUSPÄÄ benutzte Mangandioxyd zur Oxydation. Schließlich konnten ANTON und SAYRE (1) zeigen, daß sich bei Oxydation mit Natrium-meta-perjodat aus Dopamin ein Fluorophor bildet. Dieses Verfahren hat den Vorzug, daß es sehr einfach in der Handhabung ist und nur eine sehr kurze Reaktionszeit erfordert.

Im Rahmen von Untersuchungen circadianer Rhythmen wurde die Ausscheidung des Dopamins sowie anderer Verbindungen des Katecholaminstoffwechsels bestimmt. Zwei Gründe veranlaßten uns, das Bestimmungsverfahren für Dopamin zu automatisieren. Bei den oben erwähnten Untersuchungen fällt eine große Anzahl von Analysen an. Diese lassen sich bei einem automatisierten Verfahren mit einem geringeren Arbeits- und Zeitaufwand durchführen. Gleichzeitig ist die bei dieser Bestimmung erforderliche zeitliche Konstanz von Reagenzienzugabe und Reaktionsdauer gewährleistet. Das von ANTON und SAYRE (1) sorgfältig untersuchte Verfahren schien uns im Vergleich zu den anderen Methoden am einfachsten auf den Autoanalyser übertragbar zu sein. Die vorausgehende Abtrennung des Dopamins aus dem Urin erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von CROUT (10). In dieser Arbeit wird nur ihre Durchführung beschrieben. In dem gleichen Eluat können auch Adrenalin und Noradrenalin bestimmt werden. Zu deren

getrennter Bestimmung wurde das kürzlich von WEIL-MALHERBE publizierte manuelle Verfahren (11) für den Autoanalyser adaptiert. Über die Prüfung des Trennverfahrens wird im Zusammenhang mit dieser teilautomatischen Bestimmung ausführlich berichtet (12).

Methodik

Prinzip der Methode

Dopamin wird aus dem Urin durch Adsorption bei pH 8,5 an Aluminiumoxid abgetrennt. Mit Essigsäure wird es eluiert. Die Eluate werden auf pH 6,0 eingestellt. Das Dopamin wird durch Oxydation mit Natrium-meta-perjodat und nachfolgendem Zusatz einer alkalischen Natriumsulfitlösung in eine fluoreszierende Verbindung überführt.

Apparate und Glasgeräte

1. Der Autoanalyser²⁾ wird in Verbindung mit einem Turner-Fluorometer³⁾ mit einem besonderen Adapter für den Schreiber benutzt. Das Fluorometer hat eine Quecksilberlampe (110—855)³⁾ und eine 4 ml/ Quarz-Durchflußküvette. Das Primärfilter ist ein UG-11 6 mm⁴⁾ und das Sekundärfilter ein Doppelbandinterferenzfilter DAL 410 nm⁴⁾.
2. Autotitrator Typ TTT 1 C in Verbindung mit der Autobürette ABU 1 und den Elektroden G 202 C und K 401 sowie GK 2024 C⁵⁾.
3. Chromatographierohre 30 cm lang, 1 cm Durchmesser, vor dem Ablauf eine eingeschmolzene G-2-Fritte, Teflonküken.
4. Zentrifugengläser auf 15 ml/ Einguß geeicht (Höhe 15 cm, Durchmesser 2 cm).

Reagenzien

Wenn nicht besonders vermerkt, werden p. a. Reagenzien der Firma Merck, Darmstadt, benutzt.

1. Aluminiumoxid (Al₂O₃) Woelm neutral⁶⁾ (nach der Vorschrift von CROUT (10) behandelt).
2. 0,2M Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA).

²⁾ Technicon GmbH., Frankfurt/Main.

³⁾ CAMAG, Muttenz (Schweiz).

⁴⁾ Jenaer Glaswerk Schott & Gen., Mainz.

⁵⁾ Radiometer Kopenhagen (Dänemark).

⁶⁾ M. Woelm, Eschwege.

¹⁾ Dopamin = 3,4-L-Dihydroxyphenyl-äthylamin.

3. $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung (je 80 g/l).
4. 0,2M Essigsäure.
5. 0,2M Kaliumacetat-Puffer pH 6,0 (19,6 g Kaliumacetat und 0,5 ml Eisessig/l).
6. 3N KOH.
7. 2M H_3PO_4 (231 g 85proz. H_3PO_4 auf 1 l auffüllen).
8. 2N NaOH.
9. 0,1proz. NaJO_4 .
10. 5proz. Na_2SO_3 .
11. Vorratslösung Dopamin: 24,8 mg Dopamin-hydrochlorid⁷⁾ in 20 ml 0,1N HCl.
Arbeitslösung: Verdünnung der Vorratslösung 1:10 mit demin. Wasser.

Abtrennung

20 bis 50 ml filtrierter Urin werden in ein 200 ml Titration Gefäß gegeben. Die Urinprobe wird mit 5 ml 0,2M EDTA-Lösung und 3 g Al_2O_3 versetzt. Das Volumen wird anschließend mit demin. Wasser auf etwa 150 ml aufgefüllt. Mit einer $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung wird am Autotitrator der pH-Wert auf 8,5 eingestellt. Zur Vervollständigung der Adsorption wird anschließend noch 10 Min. gerührt. Dazu wird ein mechanisches Rührwerk benutzt, das das gleichzeitige Rühren von 3 Proben gestattet. Nach dem Rühren wartet man, bis sich das Al_2O_3 abgesetzt hat. Der Überstand wird mit einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgezogen. Das verbleibende Al_2O_3 wird mit etwas demin. Wasser aufgenommen und möglichst quantitativ in die Chromatographiesäulen überführt. Anschließend wird der Säuleninhalt mit 30 ml demin. Wasser gewaschen. Das Al_2O_3 hat jetzt wieder eine weiße Farbe. Dann werden 3 ml 0,2M Essigsäure auf die Säule gegeben und dieses Eluat verworfen. Die adsorbierten Katecholamine werden nun mit 10 ml 0,2M Essigsäure eluiert und in auf 15 ml Einguß geeichten Zentrifugengläsern gesammelt. Anschließend werden 0,5 ml 0,2M EDTA-Lösung zugesetzt. Die Proben werden am Autotitrator mit 3N Kalilauge auf pH 6,0 eingestellt. Mit 0,2M Kaliumacetatpuffer pH 6,0 werden sie auf 15 ml aufgefüllt und anschließend zentrifugiert, um durch die Säule gelaufene Al_2O_3 -Partikel abzutrennen. Bei der pH-Einstellung des Eluates wird eine selbstgefertigte Elektrodenhalterung benutzt. Zur Durchmischung wird Stickstoff durch die Lösung geleitet.

Bestimmung

Fließschema. Das Fließschema des Autoanalyzers für die fluorometrische Bestimmung von Dopamin ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

⁷⁾ SERVA Entwicklungslabor, Heidelberg.

Die Oxydation des Dopamins findet in zwei hintereinander geschalteten Mischspiralen statt. Die Oxydationszeit beträgt etwa 2 Min. Durch Zugabe eines Gemisches von 2N NaOH und 5proz. Na_2SO_3 -Lösung wird die Oxydation gestoppt. Die Einwirkungszeit der beiden letztgenannten Lösungen, die zunächst getrennt zugeführt, aber vor der Zugabe zu der Reaktionslösung gemischt werden, beträgt 2 Min. Anschließend wird die Probe durch Zufuhr von 2M H_3PO_4 auf pH 3,4 eingestellt. Die Lösung wird dann nach Entfernung der Luft in die Durchflußküvette des Fluorometers geführt. Die resultierende Fluoreszenz wird vom Schreiber registriert. Die Analysengeschwindigkeit beträgt 40 oder 60 Proben pro Std. Allerdings befindet sich zwischen jeder Probe ein Gefäß mit 0,2M Kaliumacetat-Puffer pH 6,0. Es werden somit in Wirklichkeit nur 20 oder 30 Analysen pro Std. durchgeführt. Da auch noch die Leerwerte gemessen werden müssen, beträgt die Gesamtanalysenzeit für 20 oder 30 Proben 2 Stdn.

Eichung

Für den Konzentrationsbereich von 12,5 ng bis 2,0 $\mu\text{g/ml}$ Probe besteht eine lineare Abhängigkeit von Fluoreszenz und Dopaminkonzentration. Durch Erhöhung der Probezufuhr lassen sich noch geringer konzentrierte Eluate analysieren. In dem Fließschema ist dies durch Weglassen der Probeverdünnung leicht möglich.

Standard. Die Berechnung des Dopamingehaltes der Proben erfolgt mit Hilfe von 3 externen Standards. Diese werden bei jeder Serie so angesetzt, daß je nach erforderlicher Spaltbreite zwischen 30 und 100 μl Arbeitslösung zu 10 ml 0,2M Essigsäure zugesetzt werden. Diese Lösung wird dann wie die Proben nach der Elution weiterbehandelt.

Leerwert. Bei diesen Versuchen wurden die Leerwerte so ermittelt, daß die Fluoreszenz nach Ersatz der Na_2SO_3 -Lösung durch demin. Wasser erneut gemessen wurde.

Berechnung

$$\mu\text{g Dopamin/ml} = \frac{C_{ST}(P_P - P_L)}{P_{ST}}$$

P_P = Peakhöhe der Probe.

P_L = Peakhöhe des Leerwertes.

P_{ST} = Peakhöhe des Standards.

C_{ST} = Konzentration des Standards in $\mu\text{g/ml}$.

Erläuterungen

Anregungs- und Emissionsspektren des Dopaminfluorophors stimmen auch bei Verwendung verschiedener Oxydationsmittel praktisch überein. Diese Tatsache macht es wahrscheinlich, daß

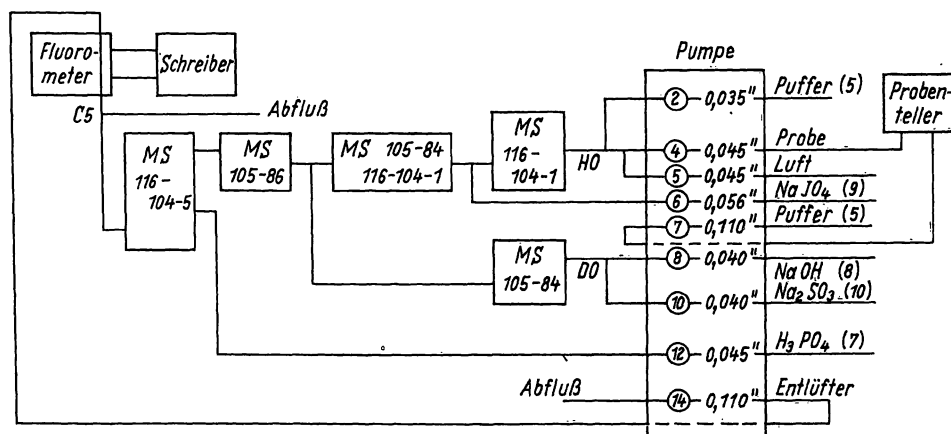


Abb. 1
Fließschema

Die Zifferangaben auf der Pumpe sind die Innendurchmesser der Pumpenschläuche in inch. Die eingekreisten Zahlen geben ihre Position auf der Pumpe an. HO, DO und C5 sind die Bezeichnungen des Herstellers für die Fittings. MS bedeutet Mischspirale. Die dazugehörigen Ziffern sind die entsprechenden Katalognummern.

MERCK

Wir sind eine weltweit tätige Unternehmensgruppe der chemisch-pharmazeutischen Industrie. Für verantwortungsvolle Aufgaben im Bereich unserer Biochemischen Abteilung suchen wir einen

Human-Mediziner

mit Laborerfahrung, dem wir die Klinische Prüfung von Diagnostica und die Pflege des wissenschaftlichen Kontaktes zu den Kliniklaboratorien übertragen möchten, sowie einen

klinischen Chemiker oder Biochemiker

für vielseitige Forschungs- und Entwicklungsaufgaben auf dem Gebiet der Klinischen Chemie. Einem qualifizierten Organiker bieten wir die Möglichkeit der Einarbeitung in dieses interessante Gebiet. Neben guter Dotierung gewähren wir die auch heute noch nicht alltäglichen Sozialleistungen unseres Hauses sowie kurzfristige Wohnungsbeschaffung. Schreiben Sie uns bitte unter Nennung Ihrer wichtigsten persönlichen und beruflichen Daten. Die Erörterung aller Einzelheiten sollte dann in einem zunächst unverbindlichen Gespräch erfolgen, zu dem wir Sie gegebenenfalls gern einladen. Diskretion sichern wir uneingeschränkt zu.

E. Merck AG, Personalabteilung I
61 Darmstadt 2, Postfach 4119

Maurer

von Dr. rer. nat. H. RAINER MAURER
Mit einem Geleitwort von E. HECKER

Disk-Elektrophorese

Theorie und Praxis
der diskontinuierlichen
Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Oktav. XVI, 221 Seiten. Mit 82 Abbildungen,
15 Tabellen, 1 Ausschlagtafel und 578 Literaturangaben
1968. Plastikeinband DM 36,—

Walter de Gruyter & Co · Berlin 30

Diagnostische Bewertung von Laborbefunden

XII/516 Seiten mit Abbildungen, Plastikeinband 48 DM

Das vorliegende Buch bringt – alphabetisch geordnet – die gebräuchlichsten und wichtigsten Laboruntersuchungen und deren differentialdiagnostische Bewertung. Auf eine Beschreibung der technischen Durchführung wurde dabei verzichtet, da es eine Fülle ausgezeichneter und ausführlicher Werke darüber gibt. Gerade aber der differentialdiagnostischen Einordnung der Laborergebnisse wird in vielen Lehr- und Laborbüchern wenig Raum gewidmet. Diese Lücke schließt dieses Werk, wobei jedoch seltene, nicht allgemein übliche Untersuchungsmethoden, Tests und Funktionsprüfungen, die besondere Spezialkenntnisse erfordern, nicht behandelt werden. Auf gute Übersichtlichkeit wurde besonderer Wert gelegt. Die hier geübte Betrachtungsweise der pathologisch veränderten Laborbefunde erleichtert das „Dran-denken“ bei der richtigen Diagnosestellung.

Im Anhang findet sich eine Zusammenstellung von Fertigreagenzien, Geräten und technischen Hilfsmitteln für das Labor, die dem interessierten Arzt, der ein neues Praxislabor eröffnen oder ein schon bestehendes erweitern will, die Auswahl erleichtern.



J. F. LEHMANNS VERLAG MÜNCHEN

BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ DE CHIMIE BIOLOGIQUE

(„Berichte der Gesellschaft für biologische Chemie“)

Unter Mitwirkung des
„CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE“
(National-Centrum für wissenschaftliche Forschung) veröffentlicht

R. PERLÈS
Hilfs-Generalsekretär

J. E. COURTOIS
Generalsekretär

Y. RAOUL
Hauptredakteur

Sekretariat und Redaktion
4, avenue de l'Observatoire, Paris (6°)

Herausgeber:
MASSON et CIE, 120, Boulevard Saint-Germain, Paris (6°)

Der „BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ DE CHIMIE BIOLOGIQUE“ veröffentlicht jährlich 11 Hefte; diese enthalten die Arbeiten der französischen Biochemiker, welche der „SOCIÉTÉ DE CHIMIE BIOLOGIQUE“ (Gesellschaft für biologische Chemie) angehören.

Abonnementspreis 1969:

Frankreich und „Franc-Zone“	150 francs
Belgien	1684 belges
Andere Länder	165 francs

immer das gleiche Reaktionsprodukt, 5,6-Dihydroxyindol, entsteht.

Die ersten Dopaminbestimmungen in unserem Laboratorium wurden manuell nach BISCHOFF und TORRES (5) durchgeführt. Wir können die Erfahrungen von WEIL-MALHERBE (11) beim Vergleich der Dopaminbestimmungen mit Jod/Kaliumjodid und Natrium-meta-perjodat als Oxydationsmittel hinsichtlich der Stabilität des Fluorophors nur bestätigen. Auch bei unseren Versuchen konnte durch Erhitzen der Proben für 30 Min. bei 45° (8) die Fluoreszenz nicht stabilisiert werden.

Dopa ergibt bei der Oxydation mit Natrium-meta-perjodat ebenfalls eine fluoreszierende Verbindung. Es kommt aber in dem Urin der von uns untersuchten Versuchspersonen nur in nicht störenden Spuren vor. Daher haben wir auf die bei den genannten Autoren (1) angegebene unterschiedliche pH-Einstellung zur differentiellen Dopa- und Dopaminbestimmung verzichtet. Als Waschlösung wird ein 0,2M Kaliumacetat-Puffer pH 6,0 benutzt, da ein Natriumacetat-Puffer gleicher Konzentration und von gleichem pH schon nach kurzem Stehen ausflockt. Da auch der Kaliumacetat-Puffer bei längerem Stehen diese Störung zeigt — wenn auch nicht so stark wie der Natriumacetat-Puffer —, sollte man ihn alle zwei Tage neu ansetzen.

Zur Abtrennung des Dopamins wurde die Technik von CROUT (10) gewählt. Von WEIL-MALHERBE (11, 13) wurde der Einwand gegen diese Methode geäußert, daß bei Verwendung von Magnetrührern auch bei größter Vorsicht das Aluminiumoxid zu kleinen Partikeln zerrieben wird. Die Folge davon ist, daß die Säulen verstopfen und Aluminiumoxidteilchen durchlaufen. Dies stimmt mit unseren Erfahrungen überein. Verwendet man aber einen mechanischen Rührer anstelle des von CROUT angegebenen Magnetrührers, so tritt die Störung nicht ein, so daß der von WEIL-MALHERBE gemachte Vorbehalt gegen dieses Abtrennverfahren entfällt.

Die analysierten Urinproben wurden nicht auf eine mittlere Wiederfindung von 75% korrigiert.

Die Frage der Leerwerte ist im Rahmen der Katecholaminbestimmung recht problematisch. Solange aber kein absolutes Bezugssystem vorhanden ist, ist eine eindeutige Entscheidung, welcher der verschiedenen Leerwerte, die benutzt werden, den wirklichen Verhältnissen am besten entspricht, nicht möglich.

Ermittlung der Meßbedingungen

Optische Meßbedingungen

Das Anregungs- und Emissionsmaximum des Fluorophors von Dopamin liegt bei 330 und 385 nm. Diese Werte wurden mit dem Zeiss-Spektralfluorometer ermittelt. Sie stimmen mit den Literatur-Angaben (1, 9, 11) überein. Da das Anregungsmaximum im kurzwelligen UV liegt, wurde eine Quarzdurchflußküvette verwandt. Als Lichtquelle wurde eine Quecksilberniederdrucklampe ausgewählt, die Licht der Quecksilberlinien 313 und 334 nm aussendet. Für das Primärfilter UG-11 6 mm gibt der Hersteller folgende optische Daten an: $\lambda_m = 332$ nm, $T_{\max} = 53\%$ und 72 nm Halbwertsbreite.

Bei Anregung mit Licht der Wellenlängen 313 und 334 nm wurden die zugehörigen Ramanmaxima in wäßr. Lösung bei 352 und 379 nm mit dem Zeiss-Spektralfluorometer ermittelt. Das Maximum der Ramanstreuung bei Anregung mit der Quecksilberlinie 334 nm fällt somit mit dem Emissionsmaximum des Dopaminfluorophors zusammen. Um den Störeinfluß durch die Ramanstreuung möglichst klein zu halten, wurde als Sekundärfilter ein Interferenzdoppelbandfilter DAL 410 nm ausgewählt, das sein Durchlaßmaximum nicht

beim Emissionsmaximum des Fluorophors hat, sondern bei 410 nm. Das Sekundärfilter hat nach Angaben des Herstellers folgende optische Eigenschaften: $\lambda_m = 406$ nm, $T_{\max} = 25\%$ und 19 nm Halbwertsbreite. Die Verwendung eines Interferenzdoppelbandfilters bringt eine größtmögliche Reduzierung des Untergrundes.

Reaktionsbedingungen

Die Konzentrationen der einzelnen Reagenzien wurden variiert, und der Einfluß auf die Fluoreszenz wurde gemessen. Das Ergebnis der Variation der Natronlaugekonzentration bei Konstanthalten der übrigen Reagenzkonzentrationen ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Es wurde eine 0,1proz. Natrium-meta-perjodat- und eine 5proz. Natriumsulfit-Lösung verwandt. Die Dopaminkonzentration betrug 0,75 µg/ml Probe. Die resultierende Fluoreszenz ist in cm der gemessenen Peakhöhen angegeben. Die pH-Werte des Reaktionsgemisches wurden elektrometrisch bestimmt.

Tab. 1

Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenz (cm Peakhöhe) von der Konzentration der Natronlauge. Die angegebenen Meßwerte sind die arithmetischen Mittel für $n = 4$

H ₃ PO ₄ (Mol/l)	NaOH (Mol/l)	Fluoreszenz (cm Peakhöhe)	pH-Wert
2	1	5,1	2,3
2	2	10,9	3,4
2	2,5	10,6	5,2
2	3	8,5	6,0
2	4	4,1	6,8

Wie die Ergebnisse in Tabelle 1 zeigen, erhält man mit 2M Phosphorsäure und 2N Natronlauge die höchsten Fluoreszenzwerte. Die für die Bestimmung angegebenen Reagenzkonzentrationen wurden in ähnlichen Versuchen ermittelt. Die Natrium-meta-perjodat-Konzentration wurde von 0,05 bis 0,2% und die Natriumsulfit-Konzentration von 0,1 bis 10% variiert. Weiterhin wurde der Einfluß der Einwirkungszeit der Natrium-meta-perjodat-Lösung, der Natronlauge-Natriumsulfit-Lösung und der Phosphorsäure untersucht. Den größten Effekt zeigte dabei die Veränderung der Mischungszeit nach Zugabe der alkalischen Natriumsulfit-Lösung.

Detergentieneinfluß

Häufig werden bei den Bestimmungen mit dem Autoanalyzer Detergentien verwandt, um ein gutes Blasenmuster zu erhalten. Bei dieser Bestimmung wurde Aerosol 22[®]) benutzt. Setzt man den Reagenzien steigende Mengen Aerosol 22 zu, so beobachtet man eine Fluoreszenzabnahme. Außerdem kommt es zu einer Erhöhung der Grundlinie. Bei einer Netzmittelkonzentration von 2 m//l Reagenz betrug die Fluoreszenzabnahme etwa 5% gegenüber Messungen mit Reagenzien ohne Detergentienzusatz. Diese Fluoreszenzabnahme kann bedingt sein durch echtes Quenching, inneren Filtereffekt oder Streulichteinfluß. Eine Störung durch Eigenfluoreszenz sowie durch Absorption von Anregungs- oder Emissionsstrahlung (innerer Filter-

[®]) Technicon GmbH., Frankfurt/Main.

effekt) konnte durch Messung von Absorptions- und Fluoreszenzspektren ausgeschlossen werden. Ob die beobachtete Fluoreszenzabnahme durch eine Peakdeformierung infolge zunehmender Ramanstreuung, durch Wechselwirkung zwischen Detergentienzusatz und Dopamin oder dessen Fluorophor oder durch beide Einflüsse bedingt ist, konnte nicht eindeutig entschieden werden. Als praktische Konsequenz folgt aus diesen Messungen, daß man entweder auf das Netzmittel ganz verzichtet oder so wenig wie möglich in konstanter Menge zusetzt.

Prüfung der Methode

Präzision in der Serie

10 Poolurinproben wurden ohne und weitere 10 Proben des gleichen Poolurins mit 5 µg Dopamin Aufstockzusatz analysiert (Tab. 2). Es wurden jeweils 20 ml Urin eingesetzt.

Tab. 2
Präzision in der Serie des Verfahrens

ohne Aufstockzusatz	mit 5 µg Aufstockzusatz
$\bar{x} = 4,3 \mu\text{g}/20 \text{ ml Urin}$	$\bar{x} = 8,1 \mu\text{g}/20 \text{ ml Urin}$
$s = 0,19$	$s = 0,16$
$V = 4,5\%$	$V = 2,0\%$
$n = 10$	$n = 10$

Die Standardabweichung ist in beiden Versuchsreihen gleich groß und unabhängig von der Konzentration.

Wiederfindung

Es wurden sowohl reine Lösungen wie auch Poolurinproben ohne und mit Dopamin als Aufstockzusatz analysiert (Tab. 3).

Tab. 3
Wiederfindung von Dopamin in reiner Lösung und Poolurin. Die angegebenen Werte sind die arithmetischen Mittel für $n = 3$

Probe	Dopaminzusatz (µg)	gefunden (µg)	Ausbeute (in %)
reine Lösung	2,5	1,9	76
reine Lösung	5,0	3,8	76
reine Lösung	10,0	7,8	78
Poolurin	—	4,9	—
Poolurin	5,0	8,6	74
Poolurin	10,0	12,5	76
Poolurin	20,0	19,8	75

Die Wiederfindungsraten liegen im Durchschnitt bei 75%. Dieses Ergebnis stimmt mit dem bei der Präzi-

sionsbestimmung gefundenen Wert und den Literaturangaben (1) überein.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze, berechnet aus den 3-s-Werten der Streuung der Leerwerte (14) von 28 verschiedenen Urinproben, liegt bei 0,01 µg Dopamin/ml Urin.

Störeinflüsse

ANTON und SAYRE (1) haben in ihrer Arbeit systematische Untersuchungen über die Fluoreszenz von analogen Verbindungen des Dopamins durchgeführt. Nach ihren Ergebnissen war keine Störung durch physiologischerweise im Urin ausgeschiedene Substanzen zu erwarten. Beim Dopa, Epinin und Isoproterenol⁹⁾ sind bei Gesunden die ausgeschiedenen Mengen zu gering. Adrenalin und Noradrenalin, die in größerer Menge ausgeschieden werden, zeigten keine Fluoreszenz. Bei der Adrenalin- und Noradrenalin-Bestimmung stört Dopamin (12). Um mit Sicherheit eine Störung der Dopaminbestimmung durch Adrenalin und Noradrenalin auszuschließen, wurden Dopaminlösungen ohne und mit steigendem Zusatz der beiden Amine analysiert. Die Dopaminkonzentration betrug 7 µg/15 ml Probe. Es wurden 3,0, 6,0, 10,0 und 20,0 µg Adrenalin sowie 4,0, 8,0, 16,0 und 24,0 µg Noradrenalin zugesetzt. Bei Dreifachbestimmungen konnte kein Störeinfluß auf die Dopaminbestimmung festgestellt werden. Anregungs- und Emissionsspektren des Dopaminfluorophors waren unter den verschiedenen Bedingungen identisch. Die Eluate von 6 verschiedenen Urinproben wurden jeweils mit 10 µg Dopamin aufgestockt. Die Wiederfindung lag zwischen 94 und 105%. Somit konnte der Einfluß von Fluoreszenzlöschern ausgeschlossen werden.

Anwendung

Abbildung 2 gibt das Teilergebn von drei verschiedenen Versuchspersonen aus einer größeren Versuchsserie über circadiane Rhythmen wieder.

Die Dopaminausscheidung ist tageszeitlichen Änderungen unterworfen. Auffällig sind die relativ kleinen

⁹⁾ Dopa = 3,4-L-Dihydroxyphenylalanin; Epinin = N-Methyl-3,4-dihydroxy-phenyl-äthylamin; Isoproterenol = 1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-isopropyl-aminoäthanol.

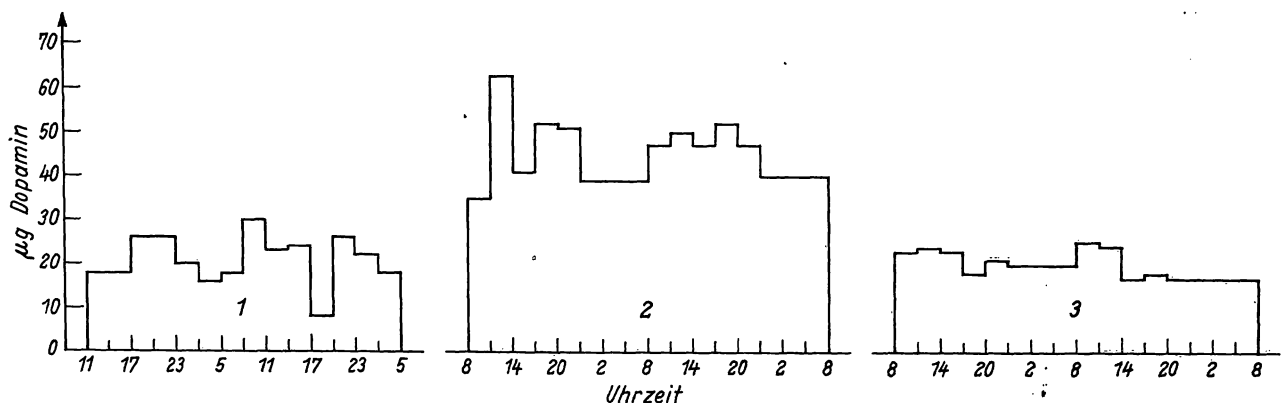


Abb. 2

Tageszeitliche Änderung der Dopaminausscheidung bei 3 verschiedenen Versuchspersonen. Die Sammelperioden betrugen 3 Std., bei den Probanden 2 und 3 nachts 9 Std.

Schwingungsbreiten. Dieses Anwendungsbeispiel zeigt, daß die beschriebene Dopaminbestimmung die notwendige Empfindlichkeit hat, um auch Proben mit geringem Dopamingehalt, wie er in 3-Std.-Urinproben vorkommen kann, zu analysieren.

Die beschriebene Methode zur Dopaminbestimmung zeigt, daß die Analysen von Urinproben zuverlässig

durchgeführt werden können. Mit dem angewandten Trennverfahren ist es möglich, Eluate frei von Fluoreszenzlöschern zu gewinnen. Die Automatisierung der Bestimmung bringt eine Arbeitszeiterparnis. Zum andern ist die zeitliche Konstanz von Reagenzienzugabe und Reaktionszeit gewährleistet. Die Präzision des Verfahrens ist unabhängig von der Konzentration.

Literatur

1. ANTON, H. A. und D. F. SAYRE, *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, Baltimore 145, 326 (1964). — 2. LAVERTY, R. und D. F. SHARMAN, *Brit. J. Pharmacol.* 24, 538 (1965). — 3. LAVERTY, R. und D. F. SHARMAN, *Brit. J. Pharmacol.* 24, 759 (1965). — 4. CARLSON, A. und B. WALDECK, *Acta physiol. Scand.* 44, 293 (1958). — 5. BISCHOFF, F. und A. TORRES, *Clin. Chem. New York* 8, 370 (1962). — 6. DRUJAN, B. D., T. L. STOURKES, D. S. LAYNE und G. F. MURPHY, *Canad. J. Biochem.* 37, 1153 (1959). — 7. v. STUDNITZ, W., H. KÄSER und A. SJOERDSMA, *New Engl. J. Med.* 269, 232 (1963). — 8. UDENFRIEND, S., in: *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, Academic Press, New York (1964). — 9. UUSPÄÄ, V. J., *Ann. med. exp. biol. Fenniae* 41, 194 (1963). — 10. CROUT, R., *Stand. Meth. Clin. Chem.* 3, 62 (1961). — 11. WEIL-MALHERBE, H., *Meth. Biochem. Anal.* 16, 293 (1968). — 12. WISSER, H., (in Vorbereitung). — 13. WEIL-MALHERBE, H., *diese Z.* 2, 161 (1964). — 14. KAISER, H., *Z. analyt. Chem.* 209, 1 (1965).

Dr. Dr. H. Wisser
Priv.-Doz. Dr. Dr. D. Stamm
Abteilung für Klinische Chemie
Max-Planck-Institut für Psychiatrie
8000 München 23
Kraepelinstr. 10